



19 BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12 **Offenlegungsschrift**
10 **DE 198 08 591 A 1**

51 Int. Cl. 6:
G 01 N 33/533
G 01 N 33/577
G 01 N 33/15
G 01 N 21/64
// G 01 N 21/49

21 Aktenzeichen: 198 08 591.5
22 Anmeldetag: 28. 2. 98
43 Offenlegungstag: 16. 9. 99

DE 198 08 591 A 1

71 Anmelder:
Universität Leipzig, 04109 Leipzig, DE

72 Erfinder:
Koksche, Mario, Dr.med., 04315 Leipzig, DE; Woinke,
Michael, 04299 Leipzig, DE

56 Entgegenhaltungen:
Datenbank: Medline auf STN. AN 94135699, AB.;
SATO, T. (u.a.), in: Thrombosis Research, 1993,
Bd.72, Nr.5, S.389-400;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Standardisierter durchflußzytometrischer Vollblutassay

57 Für die Überwachung und Optimierung der Behandlung mit Fibrinogenrezeptorantagonisten, einer neuen Klasse von antithrombotischen Medikamenten, wird ein selektiver und quantitativer Test zur Bestimmung der therapeutischen Blockade der Fibrinogenrezeptoren auf Thrombozyten benötigt.

Der beschriebene durchflußzytometrische Assay ermöglicht durch das Prinzip der Kompetition eines fluorogenen Substrates mit dem therapeutisch verwendeten Fibrinogenrezeptorblocker um die Bindung am Rezeptor eine Quantifizierung des medikamentösen Effektes auf die Thrombozyten. Die Analyse unstimulierter und maximal stimulierter Thrombozyten erlaubt die Beurteilung der Medikamentenwirkung über die gesamte Breite der aktivierungsabhängig hochregulierten Expressionsdichte der Fibrinogenrezeptoren. Zur Überwachung der Geräteeinstellung und -leistung sowie Kalibrierung der Fluoreszenzintensitäten in absolute Anzahlen gebundener fluoreszenzmarkierter Substrate werden Beads eingesetzt.

DE 198 08 591 A 1

Bestimmung der Rezeptorblockade durch Fibrinogenrezeptorantagonisten auf unstimulierten und stimulierten Thrombozyten.

Ein durchflußzytometrischer Assay auf dem Prinzip der Konkurrenz eines fluoreszenten Substrates mit einem therapeutisch eingesetzten Fibrinogenrezeptorantagonisten um die Bindung am Fibrinogenrezeptor ermöglicht die quantitative und selektive Analyse der Fibrinogenrezeptorblockade und wird in Verbindung mit der Minimierung der unspezifischen Hintergrundfluoreszenz, der Stimulation *in vitro* mit einem starken Agonisten, mit der Kalibrierung und Standardisierung der Gerätefluoreszenz sowie der Option zur Umrechnung der gemessenen Fluoreszenzsignale in die Anzahl besetzter Fibrinogenrezeptoren zu einem standardisierten Routinetest.

Die Erfindung wird nachfolgend im einzelnen dargestellt.

Prinzip

Das Prinzip des Assays besteht in der Konkurrenz therapeutisch eingesetzter Fibrinogenrezeptorantagonisten (z. B. monoklonale Antikörper wie c7E3 [Reo-Pro®], lineare oder zyklische RGD-Peptide wie Eptifibatide [Integrilin®] oder nicht-peptidische Fibrinogenrezeptorantagonisten wie Lamifiban) mit einem fluoreszenzmarkierten Fab-Fragment eines monoklonalen Antikörpers (z. B. Fab der Klone P2, LYP18 oder c7E3), einem fluoreszenzmarkierten linearen oder zyklischen RGD-Peptid oder einem nicht-peptidischen Fibrinogenrezeptorantagonisten um die Bindung am Fibrinogenrezeptor der Thrombozyten.

Ansatz

Vor Beginn der Therapie mit dem Fibrinogenrezeptorantagonisten wird eine schonende Blutentnahme beim Patienten (geringe venöse Stauung, kurze und weiltumige Kanüle) durchgeführt. Das Vollblut wird durch Verdünnen in Pufferlösung (z. B. phosphatgepufferte Kochsalzlösung [PBS] oder Hank's Balanced Salt Solution [HBSS]; pH 7,4), die humanes Immunglobulin [1 mg/ml] zur Verminderung der unspezifischen Antikörperbindung enthält, auf eine Zahl von 10.000 Thrombozyten/ μ l eingestellt.

Eine definierte Zahl von Thrombozyten wird unstimuliert mit einer sättigenden Konzentration des fluoreszenzmarkierten Substrates inkubiert und so der maximale Fluoreszenzwert der unstimulierten Probe ermittelt (entspricht 0% Rezeptorblockade). Im Parallelansatz wird die gleiche Absolutzahl von Thrombozyten mit einem starken, proteasereisistenten Agonisten maximal stimuliert (z. B. TRAP-6 mit N-terminaler Substitution von Serin durch IsoSerin) (15). Der Fluoreszenzwert nach anschließender Inkubation mit fluoreszenzmarkiertem Substrat in sättigender Konzentration entspricht 0% Rezeptorblockade bei maximal stimulierten Thrombozyten. In einem dritten Ansatz erfolgt wiederum bei gleicher Absolutzahl der Thrombozyten die *in vitro*-Blockierung aller blockierbaren GpIIb/IIIa-Rezeptoren mit dem therapeutisch eingesetzten Fibrinogenrezeptorantagonisten. Die Endkonzentration wird im Ansatz so gewählt, daß sie dem Doppelten der Medikamentenkonzentration im Vollblut entspricht, die nach Bolusgabe der maximal zur Therapie zugelassenen Medikamentendosis erreicht werden kann.

Die Identifizierung der Thrombozyten folgt in allen drei Ansätzen dem gleichen Prinzip. Verwendet wird ein fluoreszenzmarkierter monoklonaler Antikörper in sättigender Konzentration, der eine räumlich weit von der Fibrinogenbindungsstelle entfernte Struktur des Fibrinogenrezeptors erkennt und mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff als das

Substrat konjugiert ist. Es sollten zwei Fluoreszenzfarbstoffe ausgewählt werden, deren Emissionsbereiche sich nicht wesentlich überlappen (z. B. Fluoresceinisothiocyanat [FITC] mit Phycoerythrin-Cyan5 [PE-Cy5] oder Phycoerythrin [PE] mit PE-Cy5, so daß keine Kompensationsprobleme auftreten. Für die Markierung des Substrates erscheint FITC besonders geeignet, da aufgrund seines niedrigen Molekulargewichtes die Gefahr einer sterischen Behinderung am GpIIb/IIIa-Rezeptor gering ist.

Unter laufender Therapie mit einem Fibrinogenrezeptorantagonisten kann nun nach Inkubation der unstimulierten bzw. stimulierten Patiententhrombozyten mit dem fluoreszenzmarkierten Substrat aus der gemessenen Fluoreszenzintensität auf den jeweiligen Prozentsatz therapeutisch blockierter bzw. bei maximal stimulierten Thrombozyten blockierbarer Fibrinogenrezeptoren geschlossen werden.

Kalibrierung der Fluoreszenzsignale in die Anzahl geblockter Fibrinogenrezeptoren durch den therapeutisch eingesetzten Fibrinogenrezeptorantagonisten

Die gemessenen arbiträren Fluoreszenzintensitäten können nicht direkt zur Berechnung der Zahl geblockter Rezeptoren verwendet werden. Die Absolutwerte der Fluoreszenzintensitäten sind vom Durchflußzytometer, der Verstärkereinstellung des Gerätes und vom fluoreszenten Substrat abhängig. Erst die Kalibrierung der gemessenen Fluoreszenzsignale in die Anzahl blockierter Fibrinogenrezeptoren erlaubt nicht nur einen Vergleich der prozentualen Rezeptorbesetzung, sondern auch einen vom Durchflußzytometer und fluoreszenzmarkierten Substrat unabhängigen Vergleich der absoluten Rezeptorzahlen zwischen verschiedenen Labors.

Bei Verwendung von murinen fluoreszenzmarkierten Fab-Fragmenten von IgG-Antikörpern als kompetitives Substrat erfolgt die Inkubation einer sättigenden Konzentration dieser Antikörperfragmente mit einem Set von 5 Populationen von Plastekügelchen (Beads), die durch ihre unterschiedlichen Bindungskapazitäten für monoklonale Antikörper charakterisiert sind (z. B. Quantum Simply Cellular Microbead Kit® Sigma, Deisenhofen). Werden fluoreszenzmarkierte Substrate verwendet, die keine murinen monoklonalen Antikörper sind, muß die Kalibrierung bei bekanntem Fluoreszenzmolekül-Proteinmolekül-Verhältnis (F/P-Ratio) über ein Set von mehreren Plastekügelchen durchgeführt werden. Diese Beadpopulationen sind mit demselben Fluoreszenzfarbstoff wie das Substrat markiert und leuchten mit unterschiedlicher, definierter Fluoreszenzstärke (Quantum Fluorescence Kit for MESF units of FITC®, Sigma, Deisenhofen).

Gerätekalibrierung und Standardisierung

Bei quantitativen Messungen mit dem Durchflußzytometer muß mittels fluoreszenzmarkierter Plastekügelchen die Leistungsstärke des Lasers täglich kontrolliert werden. Hierfür wird das Fluoreszenzsignal dieser Beads unter denselben Geräteeinstellungen wie bei Thrombozytenmessungen analysiert. Durch Setzen eines Markers über der Beadpopulation wird deren mittlere Fluoreszenzintensität bestimmt und durch Nachstellen der Verstärkerspannung konstant gehalten.

Bei Durchflußzytometern, die in der Online-Software die Möglichkeit eines Autosetup haben (z. B. Coulter EPICS®XL mit System 2-Software), wird diese zur automatischen Nachkorrektur aktiviert. Hierfür wird in dem Protokoll zur Messung der Beads ein sehr schmaler Marker über der mittleren Fluoreszenzintensität der Beads gesetzt. Liegt

- Bokslag, M., Steiner, B., Rapold, H.J. Platelet membrane receptor glycoprotein IIb/IIIa antagonism in unstable angina. The Canadian Lamifiban Study. *Circulation* 94 (1996) 899-905
4. Collier, B.S., Lang, D., Scudder, L.E. Rapid and simple platelet function assay to assess glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade. *Circulation* 95 (1997) 860-67
5. Channing-Rodgers, R.P., Levin, J. A critical reappraisal of the bleeding time. *Semin Thromb Haemost* 16 (1990) 1-20
6. Mascelli, M.A., Lance, E., Mack, S., Weisman, H., Schaible, T., Jordan, R. Rapid assessment of platelet inhibition using a modified whole blood aggregometer (Aggrestat) in PICA patients receiving ReoPro. *J Am Coll Cardiol* 27 (1996) 361
7. Greiflich, P.E., Alving, B.M., O'Neill, K.L., Chang, A.S., Reid, T.J. Modified thromboelastography: a rapid, simple method for monitoring c7E3 Fab in heparinized patients. *Blood* 86 (1995) 545
8. Kundu, S., Herrmann, E., Sio, R., Garcia, C., Ostgaard, R. Characterization of the platelet function analyzer, PFA-100™. *Thromb Haemost* 73 (1995) 1061
9. Brecklin, H.K., Brecklin, H., Kirchmaier, C.M., Keppler, S. Methods to monitor the effects of the glycoprotein IIb/IIIa inhibitors and their interaction with other antithrombotic agents. *Thromb Haemost* 73 (1995) 1446
10. Collier, B.S., Scudder, L.E., Beer, J., Gold, H.K., Folts, J.D., Cavagnaro, J., Jordan, R., Wagner, C., Iulucci, J., Knight, D., Ghrayed, J., Smith, C., Weisman, H., Berger, H. Monoclonal antibodies to platelet gpIIb/IIIa as antithrombotic agents. *Ann N Y Acad Sci* 614 (1991) 193-213
11. Wagner, C.L., Mascelli, M.A., Neblock, D.S., Weisman, H.E., Collier, B.S., Jordan, R.E. Analysis of gpIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets. *Blood* 88 (1996) 907-914
12. Anderson, D.R., Zayed, E., Embree, J., Theroux, P., Steiner, B. Flow cytometry as a quantitative measure of the antiplatelet activity of a glycoprotein IIb/IIIa inhibitor. *Blood* 86 (1995) 893a
13. Besson, I., McGregor, M.C. Effect of antagonists on gpIIb/IIIa receptor occupancy: Use of a whole blood flow cytometry assay. *Thromb Haemost Suppl* (1997) 664
14. Faraday, N., Goldschmidt-Clermont, P., Dise, K., Bray, P.F. Quantitation of soluble fibrinogen binding to platelets by fluorescence-activated flow cytometry. *J Lab Clin Med* 123 (1994) 728-740
15. Collier, B.S., Springer, K.T., Scudder, L.E., Kutok, J.L., Cemso, M., Prestwich, G.D. Substituting isoserine for serine in the thrombin receptor activating peptide SFLLRN confers resistance to aminopeptidase M-induced cleavage and inactivation. *J Biol Chem* 268 (1993) 20741-20743

Patentansprüche

1. Assay für die Verwendung in der Durchflußzytometrie zur Analyse der Rezeptorblockade durch therapeutisch eingesetzte Fibrinogenrezeptorantagonisten, bestehend aus
- a) einem therapeutisch eingesetzten Fibrinogenrezeptorantagonisten wie monoklonale Antikörper oder Fab-Fragmente monoklonaler Antikörper oder lineare oder zyklische Peptide oder nicht-peptidische Reptorantagonisten oder Aptamere

und

- b) einem kompetitiven fluoreszenzmarkiertem Fibrinogenrezeptorantagonisten wie monoklonale Antikörper oder Fab-Fragmente monoklonaler Antikörper oder lineare oder zyklische Peptide oder nicht-peptidische Reptorantagonisten oder Aptamere.
2. Verfahren zur Bestimmung der Fibrinogenrezeptorblockade auf Thrombozyten, dadurch gekennzeichnet, daß eine Kompetition eines fluoreszenten Substrates mit einem therapeutisch eingesetzten Fibrinogenrezeptorantagonisten um die Bindung am Fibrinogenrezeptor die quantitative und selektive Analyse der Fibrinogenrezeptorblockade dergestalt ermöglicht, daß
- a) als kompetitives fluoreszenzmarkiertes Substrat monoklonale Antikörper oder Fab-Fragmente monoklonaler Antikörper oder lineare oder zyklische Peptide oder nicht-peptidische Reptorantagonisten oder Aptamere verwendet werden, die in an sich bekannter Weise mit einem kommerziellen Fluoreszenzmarkierungskit mit einem in der Durchflußzytometrie üblichen Fluoreszenzfarbstoff wie Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), energy coupled dye (ECD), PerCP®, Phycoerythrin-Cyan 5 (PE-Cy5) oder Allophycocyanin (APC) markiert sind,
- b) als therapeutisch eingesetzter Fibrinogenrezeptorantagonist monoklonale Antikörper oder Fab-Fragmente monoklonaler Antikörper oder lineare oder zyklische Peptide oder nicht-peptidische Reptorantagonisten oder Aptamere eingesetzt werden.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß
- a) dem Patienten Blut entnommen wird,
- b) das Vollblut auf eine Zahl von 10.000 Thrombozyten/µl eingestellt wird,
- c) ein Teil des verdünnten Vollblutes unstimuliert mit einer sättigenden Konzentration des fluoreszenzmarkierten Substrates inkubiert wird und nachfolgend der Fluoreszenzwert der unstimulierten Probe ermittelt wird,
- d) ein anderer Teil des verdünnten Vollblutes, der die gleiche Anzahl von Thrombozyten enthält, mit einem starken, proteaseresistenten Agonisten stimuliert wird und der Fluoreszenzwert nach anschließender Inkubation mit einer sättigenden Konzentration des fluoreszenzmarkierten Substrates gemessen wird,
- e) ein dritter Teil des verdünnten Vollblutes, der die gleiche Anzahl von Thrombozyten enthält, in vitro mit dem therapeutisch eingesetzten Fibrinogenrezeptorantagonisten versetzt wird,
- f) die Thrombozyten in den drei Volumina nach gleicher Methodik identifiziert werden,
- g) aus den gemessenen Fluoreszenzintensitäten die therapeutisch blockierten bzw. blockierbaren Fibrinogenrezeptoren rechnerisch bestimmt werden,
- h) nachdem die gemessene Fluoreszenzintensität der Thrombozyten in die Anzahl gebundener Fluoreszenzmoleküle umgerechnet wird, was nach Kalibrierung des Gerätes mit fünf verschiedenen fluoreszenten Beadpopulationen gelingt.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Einstellen auf 10.000 Thrombozyten/µl durch Verdünnen mit Pufferlösung wie phoshatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) oder mit Hanks Balanced